

APPLICATION UNDER UNITED STATES PATENT LAWS

Atty. Dkt. No. PW 280112
(M#)

Invention: Neue für das menE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Inventor (s): Mike FARWICK
Klaus HUTHMACHER
Achim MARX
Walter PFEFFERLE

Pillsbury Winthrop LLP
Intellectual Property Group
1100 New York Avenue, NW
Ninth Floor
Washington, DC 20005-3918
Attorneys
Telephone: (202) 861-3000

This is a:

- ☐ Provisional Application
- ☒ Regular Utility Application
- ☐ Continuing Application
 - ☒ The contents of the parent are incorporated by reference
- ☐ PCT National Phase Application
- ☐ Design Application
- ☐ Reissue Application
- ☐ Plant Application
- ☐ Substitute Specification
 - Sub. Spec Filed _____
 - in App. No. _____ / _____
- ☐ Marked up Specification re
 - Sub. Spec. filed _____
 - In App. No. _____ / _____

SPECIFICATION

Neue für das menE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das menE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren unter Verwendung von Bakterien, in denen das menE-Gen abgeschwächt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium

eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

- 5 Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt,
10 sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan
15 und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Lysin.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

- Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid
20 aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das menE-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das
25 die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- 30 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz
von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der O-
5 Succinylbenzoesäure-CoA-Ligase aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte
Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine
replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No.1, oder
- 10 (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i)
innerhalb des Bereichs der Degeneration des
genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den
Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen
15 hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind:

ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA,
enthaltend die Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID No.1
20 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die
Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt,
enthält;

ein Vektor, enthaltend Teile des erfindungsgemäßen
25 Polynukleotids, mindestens aber 15 aufeinanderfolgende
Nukleotide der beanspruchten Sequenz,

und coryneforme Bakterien, in denen das menE-Gen,
insbesondere durch eine Insertion oder Deletion,
abgeschwächt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums, 5 die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung 10 enthalten, sind als Hybridisierungssonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für die O-Succinylbenzoesäure-CoA-Ligase kodieren, oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder 15 Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des menE-Gens aufweisen.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen 20 hergestellt werden kann, die für die O-Succinylbenzoesäure-CoA-Ligase kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende 25 Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf 30 Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der O-Succinylbenzoesäure-CoA-Ligase und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das menE-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert werden.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer

niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden
5 Erfindung sind, können Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium
10 ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum (C. glutamicum), sind
15 besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
Corynebacterium melassecola ATCC17965
20 Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Brevibacterium flavum ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende
25 Mutanten beziehungsweise Stämme.

Das neue, für das Enzym O-Succinylbenzoesäure-CoA-Ligase (EC 6.2.1.26) kodierende menE-Gen von C. glutamicum wurde isoliert.

Zur Isolierung des menE-Gens oder auch anderer Gene von C.
30 glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in Escherichia coli (E. coli) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel

seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032 unter Verwendung des Cosmides pH79 (Hohn und Collins, 1980, Gene 11, 291-298).

Zur Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, 1979, Life Sciences, 25, 807-818) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche E. coli-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm DH5 α mc^r, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen λ -Vektoren klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z. B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von

Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Die neue für das menE-Gen kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des menE-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der

Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

- 5 Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al.
- 10 (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70%
- 15 identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschritte durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ
- 20 niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschritten durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

- Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C
- 25 eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise
- 30 durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingestellt wird. Es ist
- 35 gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x

SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des menE-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des menE-Gens oder die katalytischen Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei

- Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)), Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und
- 5 Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).
- 10 Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al.
- 15 (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und
- 20 Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.
- 25 Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense mutations“) oder Nichtsinnmutationen („nonsense mutations“)
- 30 gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar (bp) in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“), in deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren
- 35 Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen

Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers

- 5 („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.
- 10 Eine gebräuchliche Methode, Gene von *C. glutamicum* zu mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung („gene disruption“) und des Gen-Austauschs („gene replacement“).
- 15 Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al.,
- 20 Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological
- 25 Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das
- 30 zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994))
- 35 beschrieben. Methoden zur Transformation sind

beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben.

- 5 Nach homologer Rekombination mittels eines "cross-over"-Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'-Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von
- 10 Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des recA-Gens von *C. glutamicum* verwendet.

- Bei der Methode des Genaustausches („gene replacement“) wird eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder
- 15 Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für *C. glutamicum* nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation in den gewünschten Wirt von *C. glutamicum* überführt. Nach
- 20 homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden "cross-over"-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde
- 25 beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)) verwendet, um das pyc-Gen von *C. glutamicum* durch eine Deletion auszuschalten.

In das menE-Gen kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

- 30 Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des menE-Gens eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus, des Aminosäure-Exports und

gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder
5 mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym (Protein)
10 mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

So kann für die Herstellung von L-Aminosäuren neben der Abschwächung des menE-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 15 • das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 20 • das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 25 • das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),
- das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry
30 254, 395-403 (1998)),

- das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512; EP-B-0387527; EP-A-0699759; WO 00/63388),
- das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE
5 (DE-A-195 48 222),
- das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP-A 0131171),
- das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-
10 8072)) oder das für eine "feed back resistente" Threonin-Dehydratase kodierende Allel ilvA(Fbr) (Möckel et al., (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842),
- das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierenden Gen ilvBN (EP-B 0356739),
- 15 • das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen ilvD (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1973-1979),
- das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwal (DE: 19959328.0, DSM 13115)
- 20 verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des menE-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 25 • das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1, DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478, DSM 12969),

- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE:1995 1975.7, DSM 13114),
- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE: 19959327.2, DSM 13113)

5 abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des *menE*-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, in: 10 Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren 15 (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel 20 (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

25 Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“, der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 30 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette, wie zum

Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und Ethanol und organische Säuren, wie zum Beispiel Essigsäure
5 verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff
10 oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure,
15 Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind.
20 Schließlich können essentielle Wachsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen
25 Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie
30 Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende
35 Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. Um

aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 5 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem 10 Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei 15 Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren.

Folgender Mikroorganismus wurde am 26.02.2001 als 20 Reinkultur bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- Escherichia coli Top10/pCR2.1menEint als DSM 14080.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von 25 Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring 30 Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

Beispiel 1

- 5 Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *C. glutamicum* ATCC 13032

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben, isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham
10 Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)
15 dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem
20 Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym
25 BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04)
30 behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des Gens menE

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-

Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol. Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 μ g/ml Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences, U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt. Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:33893402) gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 1131 bp, welches als menE-Gen bezeichnet wurde. Das menE-Gen kodiert für ein Polypeptid von 376 Aminosäuren.

Beispiel 3

Herstellung eines Integrationsvektors für die Integrationsmutagenese des menE-Gens

Aus dem Stamm ATCC 13032 wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) chromosomale DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für *C. glutamicum* bekannten Sequenz des menE-Gens wurden die folgenden Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion ausgewählt (siehe SEQ ID No. 3 und SEQ ID No. 4):

menE-int1:
5' CTC ACT CCG TTG AAT TTG G 3'
menE-int2:
5' CAG GTG CAT TTC TGT AGC C 3'

Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit der Taq-Polymerase der Firma Boehringer Mannheim (Deutschland, Produktbeschreibung Taq DNA Polymerase, Product No. 1 146 165) die PCR Reaktion durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ermöglichen die Primer die Amplifikation eines 520 bp großen internen Fragmentes des menE-Gens. Das so amplifizierte Produkt wurde in einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch geprüft.

Das amplifizierte DNA Fragment wurde mit dem TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; Katalog Nummer K4500-01) in den Vektor pCR2.1-TOPO (Mead et al. (1991) Bio/Technology 9:657-663) ligiert.

Anschließend wurde der E. coli Stamm TOP10 mit dem Ligationsansatz (Hanahan, In: DNA cloning. A practical approach. Vol.I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA, 1985) elektroporiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden
5 Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), der mit 50 mg/l Kanamycin supplementiert worden war.
10 Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%) überprüft. Das Plasmid wurde pCR2.1menEint genannt und ist in Figur 1
15 dargestellt.

Beispiel 4

Integrationsmutagenese des menE-Gens in dem Stamm DSM 5715

Der in Beispiel 3 genannte Vektor pCR2.1menEint wurde nach der Elektroporationsmethode von Tauch et.al.(FEMS
20 Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)) in Corynebacterium glutamicum DSM 5715 elektroporiert. Bei dem Stamm DSM 5715 handelt es sich um einen AEC resistenten Lysin-Produzenten. Der Vektor pCR2.1menEint kann in DSM5715 nicht selbständig replizieren und bleibt nur dann in der
25 Zelle erhalten, wenn er ins Chromosom von DSM 5715 integriert hat. Die Selektion von Klonen mit ins Chromosom integriertem pCR2.1menEint erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring
30 Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit 15 mg/l Kanamycin supplementiert worden war.

Für den Nachweis der Integration wurde das menEint-Fragment nach der Methode "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH

(Mannheim, Deutschland, 1993) mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer markiert. Chromosomale DNA eines potentiellen Integranten wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) isoliert und jeweils mit den Restriktionsenzymen EcoRI und PstI geschnitten. Die entstehenden Fragmente wurden mittels der Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer bei 68°C hybridisiert. Das in Beispiel 3 genannte Plasmid pCR2.1menEint hatte innerhalb des chromosomalen menE-Gens ins Chromosom von DSM5715 inseriert. Der Stamm wurde als DSM5715::pCR2.1menEint bezeichnet.

Beispiel 5

15 Herstellung von Lysin

Der in Beispiel 4 erhaltene C. glutamicum Stamm DSM5715::pCR2.1menEint wurde in einem zur Produktion von Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

20 Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz Agar mit Kanamycin (25 mg/l) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die
25 Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet.

Medium Cg III

NaCl	2,5 g/l
Bacto-Pepton	10 g/l
Bacto-Yeast-Extrakt	10 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	2% (w/v)

Der pH-Wert wurde auf pH 7.4
eingestellt

5 Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 16 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur 0,1 OD betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet.

Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor)	5 g/l
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	20 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	50g/l

Salze:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	25 g/l
KH_2PO_4	0,1 g/l
$\text{MgSO}_4 * 7 \text{ H}_2\text{O}$	1,0 g/l
$\text{CaCl}_2 * 2 \text{ H}_2\text{O}$	10 mg/l
$\text{FeSO}_4 * 7 \text{ H}_2\text{O}$	10 mg/l
$\text{MnSO}_4 * \text{H}_2\text{O}$	5,0mg/l
Biotin (sterilfiltriert)	0,3 mg/l
Thiamin * HCl (sterilfiltriert)	0,2 mg/l
Leucin (sterilfiltriert)	0,1 g/l
CaCO_3	25 g/l

CSL, MOPS und die Salzlösung werden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend werden die
5 sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das trocken autoklavierte CaCO_3 zugesetzt.

Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und
10 80% Luftfeuchtigkeit.

Nach 72 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik
5 (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD(660)	Lysin-HCl g/l
DSM5715	8,2	12,64
DSM5715::pCR2.1menEint	9,2	14,89

10

Beschreibung der Figur:

Figur 1: Karte des Plasmids pCR2.1menEint.

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

KmR: Kanamycin Resistenz-Gen
EcoRI: Schnittstelle des Restriktionsenzymys EcoRI
PstI: Schnittstelle des Restriktionsenzymys PstI
menEint: internes Fragment des menE-Gens
ColE1: Replikationsursprung des Plasmides ColE1

15

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Neue für das menE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000551 BT

<140>

10 <141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 1570

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

20

<220>

<221> CDS

<222> (230)..(1357)

<223> menE-Gen

25

<400> 1

ttcgttgcca tagacatgct cttcgcagca ctgtttgcgc acgtctcctc cggcatcttt 60

gtcaccaaca atggttggga actcaccggc gcaatcggcg ctggcgcgct gcttctcatc 120

30

gcagttggcg caggtgcatg gagcatcgac ggggttctgg caaaacgcaa ggcctaaatc 180

tagcgccaca actccgaatt ctgaaccatc ggcactagaa tctcggaat atg aat act 238
Met Asn Thr

35

cgc gtc ctc gaa gca cta cct gtt gat ctt gca gat ccc acc gca att 286
Arg Val Leu Glu Ala Leu Pro Val Asp Leu Ala Asp Pro Thr Ala Ile
5 10 15

40

ctg gga gat ctc gag gac gca atc tct ggg aag aaa act ttc ctc ccc 334
Leu Gly Asp Leu Glu Asp Ala Ile Ser Gly Lys Lys Thr Phe Leu Pro
20 25 30 35

45

atc cct gta caa gat aaa acc cgt gca cag ttg ctg cgc gat tct caa 382
Ile Pro Val Gln Asp Lys Thr Arg Ala Gln Leu Leu Arg Asp Ser Gln
40 45 50

50

cga gtt ggc ctc gcc atc gat cct tcg atc gct ttg gtg atg gcc act 430
Arg Val Gly Leu Ala Ile Asp Pro Ser Ile Ala Leu Val Met Ala Thr
55 60 65

55

tct ggt tct aca ggt acc ccg aag ggc gct cag ctc act ccg ttg aat 478
Ser Gly Ser Thr Gly Thr Pro Lys Gly Ala Gln Leu Thr Pro Leu Asn
70 75 80

	ttg gtg agt tcc gcc gat gct acg cat cag ttt tta ggt ggc gaa ggc	526
	Leu Val Ser Ser Ala Asp Ala Thr His Gln Phe Leu Gly Gly Glu Gly	
	85 90 95	
5	cag tgg ttg ctt gcc atg cca gca cac cac att gca ggc atg cag gtg	574
	Gln Trp Leu Leu Ala Met Pro Ala His His Ile Ala Gly Met Gln Val	
	100 105 110 115	
10	ctt ctt cga agc ctc att gct gga gtt gag cca cta gct att gat ctc	622
	Leu Leu Arg Ser Leu Ile Ala Gly Val Glu Pro Leu Ala Ile Asp Leu	
	120 125 130	
15	agc aca ggt ttt cac att gac gct ttc gca ggc gcc gcg gca gaa ctg	670
	Ser Thr Gly Phe His Ile Asp Ala Phe Ala Gly Ala Ala Glu Leu	
	135 140 145	
20	aaa aat acc ggc gac cgc gtc tat aca tcc ttg act cca atg cag tta	718
	Lys Asn Thr Gly Asp Arg Val Tyr Thr Ser Leu Thr Pro Met Gln Leu	
	150 155 160	
25	ctt aaa gca atg gac tcc ttg caa ggc att gaa gcc ctg aaa ctt ttt	766
	Leu Lys Ala Met Asp Ser Leu Gln Gly Ile Glu Ala Leu Lys Leu Phe	
	165 170 175	
30	gat gtc att ctt gtt ggc ggt gct gca ttg tct aag cag gcc cga att	814
	Asp Val Ile Leu Val Gly Gly Ala Ala Leu Ser Lys Gln Ala Arg Ile	
	180 185 190 195	
35	tct gcg gag cag cta gac atc aac att gtc acc acc tac ggc tcc tca	862
	Ser Ala Glu Gln Leu Asp Ile Asn Ile Val Thr Thr Tyr Gly Ser Ser	
	200 205 210	
40	gag act tca ggt ggc tgc gtt tat gat ggc aag ccc att ccc ggc gcg	910
	Glu Thr Ser Gly Gly Cys Val Tyr Asp Gly Lys Pro Ile Pro Gly Ala	
	215 220 225	
45	aaa gtc cgt att tcg gat gag cgc att gag ttg ggt ggc ccg atg att	958
	Lys Val Arg Ile Ser Asp Glu Arg Ile Glu Leu Gly Gly Pro Met Ile	
	230 235 240	
50	gcg cag ggc tac aga aat gca cct gaa cat ccg gat ttc gcc aac gag	1006
	Ala Gln Gly Tyr Arg Asn Ala Pro Glu His Pro Asp Phe Ala Asn Glu	
	245 250 255	
55	ggt tgg ttt acc acc tct gat tca ggt gaa ctc cac gac ggg att ctc	1054
	Gly Trp Phe Thr Thr Ser Asp Ser Gly Glu Leu His Asp Gly Ile Leu	
	260 265 270 275	
60	acc gtg act ggt cgc gtg gat acc gtc att gat tcc ggt gga ttg aag	1102
	Thr Val Thr Gly Arg Val Asp Thr Val Ile Asp Ser Gly Gly Leu Lys	
	280 285 290	
65	ttg cac cca gag gta ctg gaa cgt gcc atc gca gat att aaa ggt gtc	1150
	Leu His Pro Glu Val Leu Glu Arg Ala Ile Ala Asp Ile Lys Gly Val	
	295 300 305	
70	acc gcg gcg tgt gtt gtg ggt att ccc gat ccc cga tta ggc caa gca	1198
	Thr Ala Ala Cys Val Val Gly Ile Pro Asp Pro Arg Leu Gly Gln Ala	
	310 315 320	

att gtg gcc gcg tac tcc gga tcg atc agt ccg tct gaa gtt att gaa 1246
 Ile Val Ala Ala Tyr Ser Gly Ser Ile Ser Pro Ser Glu Val Ile Glu
 325 330 335
 5 ggc ctc gac gat cta cct cgt tgg cag ctt ccc aaa cgg ctg aag cat 1294
 Gly Leu Asp Asp Leu Pro Arg Trp Gln Leu Pro Lys Arg Leu Lys His
 340 345 350 355
 10 ctg gaa tct ttg ccc agc att ggt cct gga aaa gct gat cga cgt gct 1342
 Leu Glu Ser Leu Pro Ser Ile Gly Pro Gly Lys Ala Asp Arg Arg Ala
 360 365 370
 15 atc gcg aag ctg ttt tagtcttcat tcttgctggc tgcaactagt tttgccacat 1397
 Ile Ala Lys Leu Phe
 375
 cttcatcggt gtacactttg gcgatctgct catcatttcc acccatgagg gtgttgccaa 1457
 20 caactagtgc tcccacttgg gtgggtgggca cgacagcgaa gtgtcggggc tgagcgtaga 1517
 cctggcgaat aggggtgatca gagegcagtg cgcaggcatg cagccatacg tca 1570
 25 <210> 2
 <211> 376
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
 30 <400> 2
 Met Asn Thr Arg Val Leu Glu Ala Leu Pro Val Asp Leu Ala Asp Pro
 1 5 10 15
 35 Thr Ala Ile Leu Gly Asp Leu Glu Asp Ala Ile Ser Gly Lys Lys Thr
 20 25 30
 Phe Leu Pro Ile Pro Val Gln Asp Lys Thr Arg Ala Gln Leu Leu Arg
 35 40 45
 40 Asp Ser Gln Arg Val Gly Leu Ala Ile Asp Pro Ser Ile Ala Leu Val
 50 55 60
 Met Ala Thr Ser Gly Ser Thr Gly Thr Pro Lys Gly Ala Gln Leu Thr
 65 70 75 80
 45 Pro Leu Asn Leu Val Ser Ser Ala Asp Ala Thr His Gln Phe Leu Gly
 85 90 95
 50 Gly Glu Gly Gln Trp Leu Leu Ala Met Pro Ala His His Ile Ala Gly
 100 105 110
 Met Gln Val Leu Leu Arg Ser Leu Ile Ala Gly Val Glu Pro Leu Ala
 115 120 125
 55 Ile Asp Leu Ser Thr Gly Phe His Ile Asp Ala Phe Ala Gly Ala Ala
 130 135 140
 Ala Glu Leu Lys Asn Thr Gly Asp Arg Val Tyr Thr Ser Leu Thr Pro
 145 150 155 160

Met Gln Leu Leu Lys Ala Met Asp Ser Leu Gln Gly Ile Glu Ala Leu
 165 170 175
 5 Lys Leu Phe Asp Val Ile Leu Val Gly Gly Ala Ala Leu Ser Lys Gln
 180 185 190
 Ala Arg Ile Ser Ala Glu Gln Leu Asp Ile Asn Ile Val Thr Thr Tyr
 195 200 205
 10 Gly Ser Ser Glu Thr Ser Gly Gly Cys Val Tyr Asp Gly Lys Pro Ile
 210 215 220
 Pro Gly Ala Lys Val Arg Ile Ser Asp Glu Arg Ile Glu Leu Gly Gly
 15 225 230 235 240
 Pro Met Ile Ala Gln Gly Tyr Arg Asn Ala Pro Glu His Pro Asp Phe
 245 250 255
 20 Ala Asn Glu Gly Trp Phe Thr Thr Ser Asp Ser Gly Glu Leu His Asp
 260 265 270
 Gly Ile Leu Thr Val Thr Gly Arg Val Asp Thr Val Ile Asp Ser Gly
 275 280 285
 25 Gly Leu Lys Leu His Pro Glu Val Leu Glu Arg Ala Ile Ala Asp Ile
 290 295 300
 Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Val Val Gly Ile Pro Asp Pro Arg Leu
 30 305 310 315 320
 Gly Gln Ala Ile Val Ala Ala Tyr Ser Gly Ser Ile Ser Pro Ser Glu
 325 330 335
 35 Val Ile Glu Gly Leu Asp Asp Leu Pro Arg Trp Gln Leu Pro Lys Arg
 340 345 350
 Leu Lys His Leu Glu Ser Leu Pro Ser Ile Gly Pro Gly Lys Ala Asp
 355 360 365
 40 Arg Arg Ala Ile Ala Lys Leu Phe
 370 375
 45
 <210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum
 50
 <220>
 <223> Primer menE-int1
 <400> 3
 55 ctcactccgt tgaatttg

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

5 <223> Primer menE-int2

<400> 4

caggtgcatt tctgtagcc

19

10

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,
enthaltend eine für das menE-Gen kodierende
5 Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid
kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2
enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens
70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ
ID No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
15 Polynukleotiden von a) oder b), und
 - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der
Polynukleotidsequenz von a), b) oder c) ,

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der O-
20 Succinylbenzoesäure-CoA-Ligase aufweist.
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt
rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
25 eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die
Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1,
30 oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
 - (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
 - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß die Hybridisierung unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird.
7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, die für ein Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2 dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
8. Coryneforme Bakterien, in denen das menE-Gen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet wird.
9. Integrationsvektor pCR2.1menEint, der
- 9.1. ein 520 bp großes internes Fragment des menE-Gens trägt,
 - 9.2. dessen Restriktionskarte in Figur 1 wiedergegeben wird, und
 - 9.3. der in dem E. coli-Stamm Top10/pCR2.1menEint unter der Nr. DSM 14080 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen hinterlegt ist.
10. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte durchführt:

- 5 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure
produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man
zumindest das menE-Gen oder dafür kodierende
Nukleotidsequenzen abschwächt, insbesondere
ausschaltet;
- b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den
Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.
- 10 11. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien
einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des
Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure
verstärkt.
- 15 12. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest
teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der
gewünschten L-Aminosäure verringern.
- 20 13. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression des
(der) Polynukleotides (e), das (die) für das menE-Gen
kodiert (kodieren) abschwächt, insbesondere
ausschaltet.
- 25 14. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die katalytischen
Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) verringert,
für das das Polynukleotid menE kodiert.
- 30 15. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen
fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder
mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 15.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
kodierende Gen dapA,
- 15.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-
Dehydrogenase kodierende Gen gap,
- 5 15.3 das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende
Gen tpi,
- 15.4 das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende
Gen pgk,
- 10 15.5 das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
kodierende Gen zwf,
- 15.6 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen
pyc,
- 15.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase
kodierende Gen mqo,
- 15 15.8 das für eine feed-back resistente
Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 15.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
- 15.10 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende
Gen hom,
- 20 15.11 das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen
ilvA oder das für eine feed back resistente
Threonin-Dehydratase kodierende Allel
ilvA(Fbr),
- 25 15.12 das für die Acetohydroxysäure-Synthase
kodierende Gen ilvBN,
- 15.13 das für die Dihydroxysäuredehydratase
kodierende Gen ilvD, und
- 15.14 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1

verstärkt bzw. überexprimiert.

16. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen
5 fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder
mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 16.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
kodierende Gen pck,
- 16.2 das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase
10 kodierende Gen pgi,
- 16.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen
poxB, und
- 16.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2
abschwächt.
- 15 17. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der
Teile des Polynukleotids gemäß Anspruch 1, mindestens
aber 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der
beanspruchten Sequenz, trägt.
18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden
20 Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man Mikroorganismen der Art Corynebacterium
glutamicum einsetzt.
19. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu
25 isolieren, die für die O-Succinylbenzoesäure-CoA-Ligase
kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des
menE-Gens aufweisen, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man das Polynukleotid,
enthaltend die Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen
30 1, 2, 3 oder 4, als Hybridisierungs sonden einsetzt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das
10 eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-
20 Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das menE-Gen abgeschwächt vorliegt, und die Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.